

鐮胞菌的分子檢測實務—以香蕉黃葉病菌為例

張碧芳助理教授

國立中興大學植物病理學系

電子郵件：pfgang@nchu.edu.tw；傳真：04-2286-0442

摘 要

香蕉黃葉病 (Panama disease) 係由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 所引起，將由南投國姓、草屯分離所得及由「臺灣香蕉研究所」提供之香蕉黃葉病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (BFO0310、BFT105、BFT202、BFO21、BFO22、BFO23、BFO24、BFO25、BFO26、BFO27、BFO28、BFO29、BFO30)、雲林西螺萵苣萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucum* (LFO11-13、LFO32-14)、彰化溪湖百合萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lilii* (F16、G16)、埔里水蛙窟及南投魚池的絲瓜萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *luffae* (FOI-114、FOI-S167)、雲林西螺茼蒿萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* (FOCh11-28)、埔里胡瓜萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerium* (FOC-100)、南投國姓西瓜蔓割病菌 *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (FNH0103)、埔里金線蓮莖腐病菌 *F. oxysporum* (F66)、亞蔬 AVRDC 之番茄萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol-4) 與南投埔里蘿蔔黃葉病 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* (FoR-4566) 等菌株，以及番茄晚疫病病菌 *Phytophthora infestans* 和水稻白葉枯病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* 等其他非鐮胞菌之病原菌，分別確定其病原性後，大量培養並抽取其菌絲核酸 (DNA)。利用 OPA 共 20 個引子組合 (Operon Technologies, Inc.)，及根據文獻建議之 DINQ、DJDH、EHKJ、HIRH、ILOE、IMBE、IMBR、NRKI、NROI 及 RKMI 等 10 個引子，針對上述各菌株之 DNA 進行「隨機增幅核酸多型性分析 (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)」。

結果以 DINQ 為引子進行 RAPD 測試，在各種供試的不同分化型之 *F. oxysporum* 菌株 DNA 中皆可增幅出約 450 bp 之特定片段，且此片段在其他非鐮胞菌之病原菌 DNA 及呂宋蕉 (*Musa* sp. Taiwan Latundan 品種) 或西瓜 (*Citrullus vulgaris* Schrad.) 之植株 DNA 中皆無法增幅出來，顯示此片段可以作為區分 *F. oxysporum* 及其他病原菌之依據。另外，針對香蕉黃葉病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 之分子檢測部分，若以 OPA-02 為引子進行 RAPD 測試，在香蕉黃葉病菌株 DNA 中可增幅出約 400 bp 之專一性片段，經純化、解序及南方雜合法分析可知絲瓜萎凋病菌株 (FOI-S167) DNA 及茼蒿萎凋病菌株 (FOCh11-28) DNA 也有類似之 400 bp 片段，但訊號較弱。目前此二個來自絲瓜萎凋病菌株及茼蒿萎凋病菌株 DNA 樣品之 400 bp 片段已經純化，並將作解序以分析其與香蕉黃葉病菌株 DNA 之片段有何不同，進一步作為設計專一性「聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)」引子對之用。由於所有供試之香蕉黃葉病菌株接種於北蕉幼苗均具病原性，但

以特定隨機引子增幅之結果，在香蕉黃葉病菌株間皆可見些微之不同，因此懷疑諸香蕉黃葉病菌株 DNA 間可能有不同的生理小種或新的遺傳變異存在。目前需重新以接種北蕉及呂宋蕉作病原性測試，以確定其是何生理小種，未來並將收集更多不同之 *Fusarium* spp. 菌株及其他香蕉病害之病原菌，再分別分析其 DNA 圖譜，以確定上述之 RAPD 片段及由 OPA-02 增幅出之 400 bp 片段所設計之專一性引子對所增幅出的片段是否分別對 *F. oxysporum* 菌株及香蕉黃葉病菌具專一性，藉以供作偵測香蕉黃葉病菌之用。

緒 言

香蕉黃葉病（又稱「巴拿馬病」及「鐮胞菌萎凋病」，Banana yellows, Panama disease, Fusarial wilt of banana）為危害香蕉產業之重要病害，其病原菌為尖鐮胞菌香蕉分化型 *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder & Hansen（黃與孫，1997）。台灣之香蕉栽培於 1960 年代曾高達四萬多公頃，香蕉產業達到高峰，外銷量高居世界第四名，使台灣成為「香蕉王國」（黃，2000），但於 1967 年屏東縣佳冬地方出現黃葉病至今三十餘年來（蔡與陳，1971；蔡等，1972），此病發生面積高達四千多公頃，且已由高屏地區蔓延至臺灣中部，目前栽培面積只剩七千多公頃（黃，2002）。臺灣之栽培香蕉多為華蕉，是本菌第一生理小種（race 1）的抗病品種，但卻不具有抵抗本菌之第四號生理小種（race 4）的能力（莊，1973；1981；Su *et al.*, 1977；1986）。香蕉黃葉病乃土傳性之鐮胞菌病害，此病害之傳播可由土壤之移動（藉人力，農具或車輛等），罹病株殘體被人攜帶，流水及風力傳播，河水氾濫也可將病株殘體帶至他處，而帶病之吸芽及蕉園中之雜草也是病害傳播者，公認為極難防治，須改種抗病品種才得復興香蕉產業（黃，1985；孫，1996；孫與黃，1996）。華蕉為三倍體不產種子，栽培需用無性繁殖之種苗，目前蕉農為防止本病蔓延，除使用「臺灣香蕉研究所」發展之抗病組織培養苗（佔所有種苗四分之一左右）外，也常用根莖及抗病性較佳之吸芽苗種植，並自行於蕉園內取得，但帶菌之根莖及已被感染卻未表現病徵之吸芽苗，反而成為其主要傳染原而助長本病蔓延，因此，如何快速鑑定種苗是否健康不帶病菌，實為防治香蕉黃葉病蔓延之最佳方法。本檢測技術即在針對香蕉之重要種苗病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense*，應用「隨機增幅核酸多型性分析（Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD）」之方法，尋得一專一性核酸片段，並設計出專一性「聚合酵素連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）」檢測法，可用於香蕉種苗病原菌之快速檢疫工作及其健康種苗之篩選。

香蕉黃葉病菌之分子檢測

供試菌株之菌絲培養

供試菌株包括：由南投國姓、草屯分離所得之香蕉黃葉病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (BFO0310、BFT105、BFT202)，與「臺灣香蕉研究所」提供之香蕉黃葉病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (BFO21、BFO22、BFO23、BFO24、BFO25、BFO26、BFO27、BFO28、BFO29、BFO30) 等菌株；由本系植物病害管理研究室（黃振文教授）提供之雲林西螺萵苣萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucum* (LFO11-13、LFO32-14)，彰化溪湖百合萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lilii* (F16、G16)，雲林西螺萵苣萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* (FOCh11-28)，南投國姓西瓜蔓割病菌 *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (FNH0103)，南投埔里蘿蔔黃葉病菌 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* (FoR-4566)，番茄晚疫病菌 *Phytophthora infestans*，及該研究室取自亞蔬 (AVRDC) 之番茄萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol-4) 等菌株；由本系土壤傳播性作物病害研究室（林益昇教授）提供之埔里水蛙窟及南投魚池的絲瓜萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *luffae* (FOI-114、FOI-S167)，與埔里胡瓜萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerium* (FOC-100) 等菌株；以及由植物流行病學研究室（謝式坪鈺教授）提供之埔里金線蓮莖腐病菌 *F. oxysporum* (F66) (詳見表一)。

將各菌株單胞分離培養在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA) 斜面上，培養一星期作為接種源。以 10 ml 無菌水倒入長滿菌絲之 PDA 斜面，劇烈震盪，並以消毒過的移植環將菌絲刮下製成孢子懸浮液。每菌株孢子懸浮液 30 ml 倒入經高溫高壓滅菌 (121°C, 15 lb/in², 15 分鐘) 後的馬鈴薯葡萄糖煎汁 (PDB, 購自 DIFCO Lab., Detroit, MI) 250 ml，搖晃均勻，分裝到 20 個直徑 9 公分培養皿中，於 24°C，12 小時光照下，培養一個星期。用紗布過濾培養液，得到菌絲，以無菌水將多餘 PDB 洗淨，置於 -20°C 中進行真空乾燥菌絲。

菌絲總量 DNA 之萃取

以修改過之 Dellaporta 植物 DNA 小量萃取法 (Dellaporta *et al.*, 1983) 抽取菌絲總量 DNA，程序如下 (Chang *et al.*, 1996)：

1. 取菌絲乾重量 0.3 g，置於研鉢中 (先用液態氮預冷)，以液態氮研磨成粉末狀。
2. 待液態氮揮發完全後，加入 22.5 ml DNA 抽取液 (其配法為：取 1M Tris-HCl, pH 8.0, 10 ml；0.5M Na₂EDTA, pH 8.0, 10 ml；NaCl, 2.92 g；加 dH₂O 至 100 ml 後滅菌；使用前必須在抽風櫃內加入 β-mercaptoethanol, 79 μl 於抽取液中) 及 1.5 ml 20% SDS，研磨並混合均勻後倒入 30 ml 圓底離心管 (Oak Ridge centrifuge tube) 中。
3. 栓緊管蓋，用手搖晃均勻，置於 65°C 熱水浴 10 分鐘，期間每 1~2 分鐘

即取出來搖晃均勻一次，熱水浴後置於室溫冷卻。

4. 加入 7.5 ml 5M KOAc (醋酸鉀)，充分混合，將 Oak Ridge tube 插入碎冰中冰浴 20 分鐘。
 5. 以 15,000 rpm (HITACHI SCR20B 離心機，rotor 型號 PRP-20)，4°C 離心 20 分鐘。
 6. 將上清液經由先以 DNA 抽取液潤濕的 8 層紗布與漏斗過濾，扭轉紗布直到滴不出濾液為止，將濾液裝在新的 Oak Ridge tube 中。
 7. 加入 15 ml 預冷過 (-20°C) 的 isopropanol，溫和搖晃均勻，此時可看見呈不規則絲狀的核酸。以滅過菌的巴斯德吸管勾取黏稠的核酸，置入滅過菌的 1.5 ml 微量離心管。若絲狀核酸不多，也可重複步驟 5 之高速離心，並將沉澱物回收置入滅過菌的 1.5 ml 微量離心管。
 8. 用 1 ml 現配的 70% 酒精清洗核酸，以 14,000 rpm (Sigma 2MK 桌上型離心機，10,000 $\times g$) 於 4°C 下離心 5 分鐘。並重複本步驟一次。
 9. 將殘留酒精吸乾，倒放微量離心管在試管架上晾乾 5 分鐘。以 400 μ l 37°C 之 0.1 \times TE (1 \times TE: 10mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0，滅菌冷卻後備用) 溶解 DNA，加入 3 μ l RNase A (10 mg/ml TE) 輕柔搖晃，直到所有沉澱溶解為止，若有不溶的 DNA，則再加 400 μ l 0.1 \times TE 直到所有 DNA 溶解為止。
 10. 將每 400 μ l DNA 溶液裝入一個 1.5 ml 微量離心管中，每管加入 400 μ l phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v)，用手輕搖至上層液成乳狀混濁。
 11. 以 14,000 rpm 於 4°C 下離心 5 分鐘。將含有 DNA 之上層液小心吸出到另一新的 1.5 ml 微量離心管 (不可吸到白色中間薄層)。加入 400 μ l chloroform-isoamyl alcohol (24:1, v/v)，輕微搖晃均勻 1 分鐘。
 12. 以 14,000 rpm 於 4°C 下離心 5 分鐘。小心吸取上層液到另一新的 1.5 ml 微量離心管，以 0.1 \times TE buffer 調整體積至 400 μ l。
 13. 加入 40 μ l (1/10 體積) 3M NaOAc (醋酸鈉, pH 5.2)，輕柔搖晃均勻。再加入 1000 μ l 絕對酒精 (-20°C)，輕柔搖晃溶液至均勻，放入 -20°C 靜置 30 分鐘。
 14. 以 14,000 rpm 於 4°C 下離心 5 分鐘，倒掉上清液。
 15. 用 1 ml 現配的 70% 酒精清洗核酸，以 14,000 rpm (Sigma 2MK 桌上型離心機，10,000 $\times g$) 於 4°C 下離心 15 分鐘。並重複本步驟一次。
 16. 吸乾殘留酒精，倒放微量離心管在試管架上晾乾數分鐘，或以真空乾燥約 3 分鐘 (至核酸沉澱物無明顯水氣即可，不可過乾否則不易溶解)。
 17. 加入 400 μ l 65°C 之 0.1 \times TE buffer，待 DNA 全溶解後，保存在 -20°C 備用。
- 北蕉 (*Musa sp.* Cavendish 品種)、呂宋蕉 (*Musa sp.* Taiwan Latundan 品種) 及西瓜 (*Citrullus vulgaris* Schrad.) 之總量 DNA 也以相同方法萃取，但取 1 g 鮮重組織加入 22.5 ml DNA 抽取液中進行之。水稻白葉枯病之病原細菌 *Xanthomonas*

campestris pv. *oryzae* 的 DNA 則由分子植物病理研究室（曾德賜教授）提供。

DNA 濃度及純度測定

DNA 混合均勻，取 5 μ l 加 95 μ l 0.1 \times TE buffer 稀釋 20 倍，取 100 μ l，以 GeneQuant *Pro* 光譜儀 (spectrophotometer；由 Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Cambridge, England 出品) 測定 OD_{260nm} 之讀值，以計算 DNA 之濃度 (以 0.1 \times TE buffer 歸零)，並測定 OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值，以確定 DNA 之純度 (OD_{260nm}/OD_{280nm} 之比值在 1.8 左右時，DNA 純度為最佳)。

RAPD 反應

本研究所使用的隨機引子、引子序列及其在 PCR 反應 (Chang *et al.*, 1993) 中所用的煉合 (annealing) 溫度如表二所示，其中 OPA 共 20 個引子組合由 Operon Technologies, Inc., Alameda, CA 出品；而依據 Bentley 等人於 1998 年發表的論文中所用的 DINQ、DJDH、EHKJ、HIRH、ILOE、IMBE、IMBR、NRKI、NROI 及 RKMI 等 10 個引子則委由 BIOBASIC Inc., Canada 代為合成。將 RAPD 反應所需材料加入 0.2 ml 的微量離心管，各反應物除 dNTP (去氧核糖核苷三磷酸鹽) 由吉恩馬克公司 (GeneMark Tech. Co., Ltd., Tainan, Taiwan) 出品外，其餘之 Thermostable DNA polymerase、10 \times 反應緩衝液、及 MgCl₂ (氯化鎂) 皆由生工有限公司 (MD Bio, Inc., Taipei, Taiwan) 出品，RAPD 之各反應物及成分如下：

總量 DNA (5 ng/ μ l)	10	μ l ;
OPA-02 或 DINQ 引子 (25 pmol/ μ l)	1	μ l ;
10 \times 反應緩衝液 (不含 Mg ²⁺)	2.5	μ l ;
MgCl ₂ (25mM)	2.5	μ l ;
dNTP (2.5 mM)	2.5	μ l ;
Thermostable DNA polymerase (5 Unit/ μ l)	0.25	μ l ;
ddH ₂ O	6.25	μ l
反應總體積	25	μ l 。

各反應物混合均勻並以 6,000 rpm (約 2,000 $\times g$) 短暫離心數秒後，將 0.2 ml 的微量離心管放置在熱循環器 (PTC-200 DNA Engine, MJ Research, Inc., Watertown, MA)，設定下列循環：

	變性 95°C	煉合 42°C (OPA-02 引子) 33°C (DINQ 引子)	合成 72°C	循環數 (cycle)
Program 1	1 分鐘	0 秒	0 秒	1

Program 2	30 秒	30 秒	90 秒	35
Program 3	0 秒	0 秒	10 分鐘	1

水平式電泳分析

增幅後之核酸產物以水平式電泳分析，方法如下：

1. 瓊脂膠體 (agarose, 1.5%) 之配製：秤取 2.7 g agarose 加入 180 ml 的 0.5×TAE buffer (20 mM Tris base, 20 mM acetate, 0.5 mM EDTA)，以微波爐加熱至完全溶解，混合均勻並待溫度冷卻至約 50°C 時，倒入 20.5×8 公分平方之製膠槽中 (MIDICELL EC350 電泳槽，E-C Apparatus Co., Holbrook, N.Y.)，插上尺梳，待膠體凝固後備用。
2. 將凝固後之膠體放入電泳槽中，加入適量之 0.5×TAE buffer 至液面高出膠體約 1 公分為止，小心將尺梳向上拔出，注意不可破壞膠體之樣品槽 (well)。
3. 取 25 µl 增幅後之 DNA 產物，與 3 µl 的追蹤液 (6×DNA Loading Dye: 0.2% bromophenol blue, 0.2% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60 mM EDTA; Protech Tech., Taiwan 出品) 充份混合，以微量吸管吸出，小心將其置入 (loading) 膠體的樣品槽中，並另置入 5 µl Gen-100 DNA ladder (GeneMark Tech. Co., Ltd., Taiwan) 作為 DNA 大小之標幟 (size marker)。
4. 以 68 V 的電壓 (EC105 電源供應器，E-C Apparatus Co., Holbrook, N.Y.) 進行電泳分析，約 90 分鐘。若以可同時承載二片膠體之大型電泳槽 (MAXICELL PRIMO EC340 電泳槽，E-C Apparatus Co., Holbrook, N.Y.)，則需以 150 V 的電壓進行電泳分析，約 80 分鐘。
5. 取出膠體，經溴化乙錠 (ethidium bromide, 0.5 mg/ml) 染色 20 分鐘，並用一次蒸餾水退染 5 分鐘。
6. 置於 UV 箱 (波長 312 nm) 上觀察，並利用拍立得照相機及 Polaroid Type 667 底片照相紀錄結果。

核酸探針之製備及南方雜合分析

以 OPA-02 引子將香蕉黃葉病菌株 BFO0310 之 DNA 進行 RAPD，其產物經 1.5% 電泳凝膠分離後，切出 400 bp 之專一性片段，使用 GeneMark Gel Elution Kit (GeneMark Tech. Co., Ltd., Taiwan) 將 400 bp 片段回收，再以 pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI) 將此 400 bp 片段連結至 vector 上，轉形 (transformation) 入 *Escherichia coli* (DH5α) 中，經由含 Ampicillin (100 µg/ml) 之 LB agar plate 篩選，選殖出具有 vector 之菌株，以 LB 養菌，抽取其質體，再由限制酵素 *Eco* RI 切割，以電泳確定有香蕉黃葉病菌株之 400 bp 片段存在，即回收此 OPA-02₄₀₀ 片段作為雜合之探針 (Sambrook *et al.*, 1989)，並解序此一片段 (Sanger *et al.*, 1977)。另以 DINQ 引子將香蕉黃葉病菌株 BFO0310 之 DNA 進

行 RAPD，以 1.5% 之電泳凝膠將 450 bp 之特定片段分離後切出，以上述方法將此 450 bp DNA 片段回收並進行選殖(Sambrook *et al.* 1989)，經由限制酵素 *Eco* RI 切割，並以電泳確定有香蕉黃葉病菌株之 450 bp 片段存在，即可回收此 DINQ₄₅₀ 之 DNA 片段作為雜合探針 (Sambrook *et al.*, 1989)，並解序此一片段 (Sanger *et al.*, 1977)。

將以 OPA-02 及 DINQ 為引子進行 RAPD 之產物的電泳膠放入 Denaturing Solution (1.5M NaCl, 0.5N NaOH) 30 分鐘，再用 Neutralizing Solution (1M Tris base, 1.5M NaCl, pH 7.4) 中和 30 分鐘，再轉漬到 Hybridization Transfer Membrane (NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA)，並使用 VersiTag Fluorescein Labeling System (NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA)，標定上述之核酸探針，分別進行南方雜合分析 (Southern., 1975；VersiTag Fluorescein Labeling System 之產品說明書)。

結 果

以 DINQ (5'-CTGGCCCA-3') 為引子進行 RAPD 測試，在各種供試的不同分化型之 *F. oxysporum* 菌株 DNA 中皆可增幅出約 450 bp 之特定片段(圖一)，且此片段在其他非鐮胞菌之病原菌 DNA 及呂宋蕉 (*Musa* sp. Taiwan Latundan 品種) 或西瓜 (*Citrullus vulgaris* Schrad.) 之植株 DNA 中皆無法增幅出來，顯示此片段可以作為區分 *F. oxysporum* 及其他病原菌之依據。此結果之正確性將進一步以南方雜合分析法證實之，目前已將此 450 bp 片段純化並選殖，將作解序以供設計專一性 PCR 引子對之用。。

此外，香蕉黃葉病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) 之菌株重新確定病原性後，抽取其菌絲 DNA 進行 RAPD 分析。結果顯示，OPA-02 引子 (5'-TGCCGAGCTG-3') 在已確定病原性之香蕉黃葉病菌株 DNA 中可增幅出一近 400 bp 之專一性片段 (圖二)，此 OPA-02 引子所增幅的 400 bp 專一性片段已分離、純化並解序，但其序列與目前資料庫中已發表之基因序列並無相似。將此片段作為探針對 OPA-02 之 RAPD 產物進行南方雜合分析之結果，顯示除了香蕉黃葉病菌株 DNA 之外，絲瓜萎凋病菌株 (FOI-S167) DNA 及茼蒿萎凋病菌株 (FOCh11-28) DNA 也有近 400 bp 的雜合條帶，但其訊號較弱，目前已將此二個來自絲瓜萎凋病菌株及茼蒿萎凋病菌株 DNA 樣品之 400 bp 片段純化並選殖，將作解序以分析其與香蕉黃葉病菌株 DNA 之 400 bp 片段有何不同，以供設計專一性 PCR 引子對之用。此外，利用 DINQ (圖一) 及 OPA-02 (圖二) 引子所得香蕉黃葉病菌株之 DNA 圖譜中，可見各菌株間有明顯差異，懷疑諸香蕉黃葉病菌株間可能有不同的生理小種或在抗病組培苗之篩選過程及不同栽培地區中，香蕉黃葉病菌已分別出現新的遺傳變異。而在 BFO0310 菌株中，正常具病原性之 BFO0310S 菌株及已變異且病原性已減弱之 BFO0310R

菌株的 DNA 圖譜中 (圖一、圖二), 也可見二菌株間有明顯差異, 可見在變異之香蕉黃葉病菌中, 其菌落型態與外觀的改變可能是由於其遺傳物質發生改變所引起。

討 論

雖然 RAPD 分析也是一種快速增幅 DNA 以觀察其差異的方法, 但其結果之再現性較低且不穩定, 在本研究過程中也曾經發生此現象。因此, 為了達到對病原菌作快速的偵測 (detection) 及診斷 (diagnosis) 的目的, 設計菌株專一性的引子對配合 PCR 增幅反應應為較理想的方法。

本研究已利用 RAPD 分析法找到分別屬於 *F. oxysporum* 及香蕉黃葉病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) 之專一性片段, 但需要再收集更多的 *Fusarium* spp. 菌株及其他香蕉病害之菌株來確認其專一性, 並進一步純化、定序, 用來設計具專一性之 PCR 引子對, 以期將來能作為偵測 *F. oxysporum* 及香蕉黃葉病菌之用。另外, 同是香蕉黃葉病菌也有不同的 DNA 圖譜, 因此本研究中所收集的香蕉黃葉病菌株間可能有不同的生理小種 (race 1 及 race 4) 存在, 或是在抗病組培苗之篩選過程及不同栽培地區中, 香蕉黃葉病菌已分別出現新的遺傳變異, 值得深入探討。而在正常具病原性之 BFO0310S 菌株及已變異且病原性已減弱之 BFO0310R 菌株的 DNA 圖譜中, 也可見二菌株間有明顯差異, 可見在香蕉黃葉病菌中, 其菌落型態與外觀產生變異之原因, 可能是由於其遺傳物質發生改變所引起, 值得進一步深究。未來希望能找到可分出不同生理小種的專一性片段, 用於調查田間香蕉黃葉病菌的分布, 另外也可作為香蕉健康種苗檢查之依據。將來若能取得 *F. oxysporum* race 2 及 race 3 的菌株 DNA, 更可據此開發相關之偵測技術, 建立種苗病原真菌之快速檢疫技術, 以防杜國外香蕉黃葉病菌之引入, 落實檢防疫工作之執行。

引用文獻

- 孫守恭、黃振文。1996。台灣植物鐮胞菌病害。世維出版社。台中市, 170 頁。
- 孫守恭。1996。台灣果樹病害。世維出版社。台中市, 427 頁。
- 莊再揚。1973。台灣香蕉黃葉病菌之生理與生態之研究。台灣大學植物病蟲害學系碩士論文, 64 頁。
- 莊再揚。1983。台灣中部香蕉黃葉病菌生理小種之鑑定。植保會刊 25:57-58。
- 黃振文、孫守恭。1997。台灣產鐮胞菌。世維出版社。台中市, 116 頁。
- 黃新川。1985。香蕉黃葉病之生態與防治。植保會刊 27:233-245。
- 黃新川。2000。香蕉黃葉病。植物疫情與策略。中華植物保護學會出版。台中縣,

第 45-58 頁。

黃新川。2002。組培技術在香蕉黃葉病防治上之應用。植病會刊 11:57-61。

蔡雲鵬、陳復漢。1971。台灣之香蕉萎凋病：(1)生態及藥劑防治初期研究。植保會刊 14:65-73。

蔡雲鵬、蘇鴻基、黃平和。1972。台灣香蕉萎凋病之發病概況，緊急措施及田間防治試驗。果農合作 301:5-10。

Bentley, S., Pegg, K. G., Moore, N. Y., Davis, R. D., and Buddenhagen, I. W. 1998.

Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. *Phytopathology* 88:1283-1293.

Chang, P. F. L., Narasimhan, M. L., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. 1993.

Quantitative mRNA-PCR for expression analysis of low-abundance transcripts. *Plant Molecular Biology Reporter* 11, 237-248.

Chang, P. F. L., Damsz, B., Kononowicz, A. K., Reuveni, M., Chen, Z., Xu, Y.,

Hedges, K., Tseng, C. C., Singh, N. K., Binzel, M. L., Narasimhan, M. L.,

Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. 1996. Alterations in cell membrane structure and expression of a membrane-associated protein after adaptation to osmotic stress. *Physiologia Plantarum* 98:505-516.

Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: preparation

version II. *Plant Mol. Biol. Reporter* 1:19-21.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory*

Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-

terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments

separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.

Su, H. J., Chung, T. Y., and Kong, W. S. 1977. Physiological race of fusarial wilt

fungus attacking Cavendish banana of Taiwan. *Taiwan Banana Res. Inst. Spec.*

Publ. 2. 21 pp.

Su, H.-J., Hwang, S.-C., and Ko, W.-H. 1986. Fusarial wilt of Cavendish bananas in

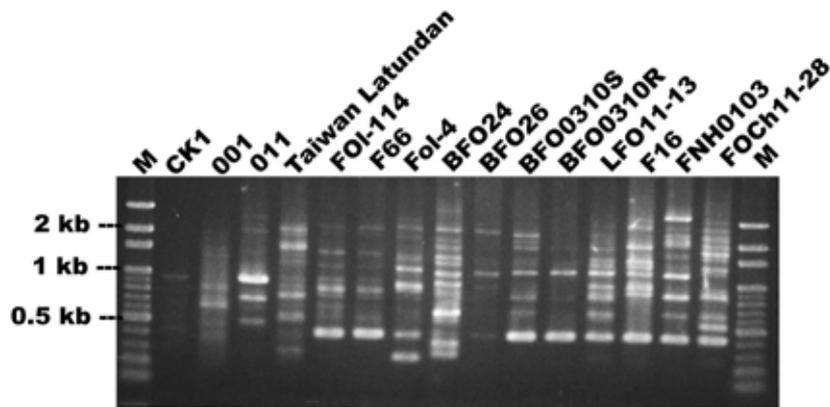
Taiwan. *Plant Dis.* 70:814-818.

表一、供萃取總量 DNA 之供試菌株或植物及其來源與編號

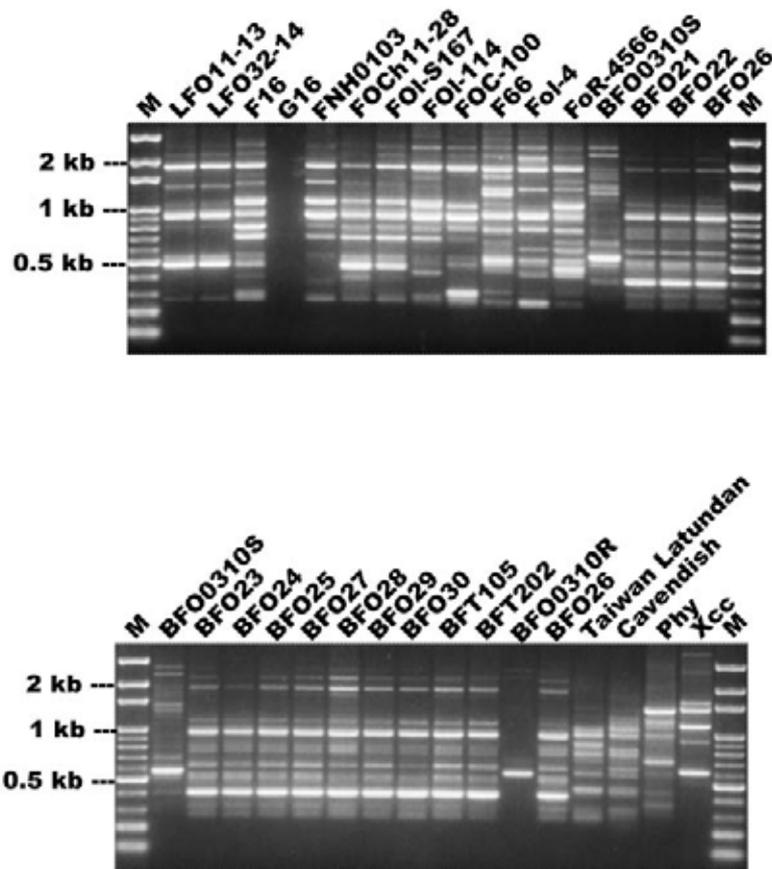
提供者	採集地	寄主、病名	菌學名	編號
黃振文教授研究室	雲林西螺	萵苣萎凋病	<i>Fusarium oxysporum</i> f.	LFO11-13
			<i>sp. lactucum</i>	LFO32-14
	彰化溪湖	百合萎凋病	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. lilii</i>	F16、G16
	南投國姓	香蕉黃葉病	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp.</i>	BFO0310
			<i>cubense</i>	
	南投草屯	香蕉黃葉病	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp.</i>	BFT105
			<i>cubense</i>	BFT202
	雲林西螺	茼蒿萎凋病	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp.</i>	FOCh11-28
			<i>chrysanthemi</i>	
	南投國姓	西瓜蔓割病	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp.</i>	FNH0103
		<i>niveum</i>		
亞蔬 AVRDC	亞蔬	番茄萎凋病	<i>Fusarium oxysporum</i> f.	Fol-4
			<i>sp. lycopersici</i>	
	南投埔里	蘿蔔黃葉病	<i>F. o. f. sp. raphani</i>	FoR-4566
			番茄晚疫病	<i>Phytophthora infestans</i>
臺灣香蕉研究所		香蕉黃葉病	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp.</i>	BFO21、BFO22
			<i>cubense</i>	BFO23、BFO24
				BFO25、BFO26
				BFO27、BFO28
				BFO29、BFO30
謝式垵鈺教授研究室	南投埔里	金線蓮莖腐病	<i>F. oxysporum</i>	F66
林益昇教授研究室	埔里水蛙窟	絲瓜萎凋病	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. luffae</i>	FOI-114
	南投魚池	絲瓜萎凋病	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. luffae</i>	FOI-S167
	南投埔里	胡瓜萎凋病	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp.</i>	FOC-100
<i>cucumerium</i>				
曾德賜教授研究室		水稻白葉枯病	<i>Xanthomonas campestris</i>	Xcc
			<i>pv. oryzae</i>	
臺灣香蕉研究所		呂宋蕉	<i>Musa</i> sp. Cavendish 品種	Cavendish
臺灣香蕉研究所		北蕉	<i>Musa</i> sp. Taiwan Latundan 品種	Taiwan Latundan
鳳山熱帶試驗分所		西瓜	<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad.	001、011

表二、隨機引子的序列及其在 PCR 反應中所用的煉合 (annealing) 溫度

編號	序列 (5' 到 3')	煉合溫度 (°C)
OPA-01	CAGGCCCTTC	42
OPA-02	TGCCGAGCTG	42
OPA-03	AGTCAGCCAC	42
OPA-04	AATCGGGCTG	42
OPA-05	AGGGGTCTTG	42
OPA-06	GGTCCCTGAC	42
OPA-07	GAAACGGGTG	42
OPA-08	GTGACGTAGG	42
OPA-09	GGGTAACGCC	42
OPA-10	GTGATCGCAG	42
OPA-11	CAATCGCCGT	42
OPA-12	TCGGCGATAG	42
OPA-13	CAGCACCCAC	42
OPA-14	TCTGTGCTGG	42
OPA-15	TTCCGAACCC	42
OPA-16	AGCCAGCGAA	42
OPA-17	GACCGCTTGT	42
OPA-18	AGGTGACCGT	42
OPA-19	CAAACGTCGG	42
OPA-20	GTTGCGATCC	42
DINQ	CTGGCCCA	33
DJDH	ACCAGCCA	33
EHKJ	GCTCACGA	33
HIRH	ACGTCCAC	33
ILOE	GATGAGCC	33
IMBE	GAAACGCC	33
IMBR	GTAACGCC	33
NRKI	CCTCGTGG	33
NROI	CCTGGTGG	33
RKMI	CCCGTGGT	33



圖一、使用 DINQ 引子 (5'-CTGGCCCA-3') 對雲林西螺萵蒿萎凋病菌 (FOCh11-28)，南投國姓西瓜蔓割病菌 (FNH0103)，彰化溪湖百合萎凋病菌 (F16)，雲林西螺萵苣萎凋病菌 (FLO11-13)，亞蔬 AVRDC 之番茄萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol-4)，埔里金線蓮莖腐病菌 (F66)，埔里水蛙窟的絲瓜萎凋病菌 (FOI-114)，健康呂宋蕉 (Taiwan Latundan) 與西瓜 (001、011) 組織，及南投國姓與香蕉試驗所提供之香蕉黃葉病菌 (BFO0310、BFO24、BFO26；其中 BFO0310 之「S」為正常之具病原性菌株，而「R」為已變異之菌株，其病原性已減弱) 等菌株之菌絲 DNA 進行 RAPD 分析之電泳圖。CK1：不加 DNA 之對照組反應；M：100 bp DNA ladder，為其 DNA 大小之標幟 (size marker)。



圖二、使用 OPA-02 引子 (5'-TGCCGAGCTG-3') 對雲林西螺萵苣萎凋病菌 (FLO11-13、FLO32-14)，彰化溪湖百合萎凋病菌 (F16、G16)，南投國姓西瓜蔓割病菌 (FNH0103)，雲林西螺萵苣萎凋病菌 (FOCh11-28)，南投魚池及埔里水蛙窟的絲瓜萎凋病菌 (FOI-S167、FOI-114)，埔里胡瓜萎凋病菌 (FOC-100)，埔里金線蓮莖腐病菌 (F66)，亞蔬 AVRDC 之番茄萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol-4)，南投埔里蘿蔔黃葉病 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* (FoR-4566)，健康北蕉 (Cavendish) 與呂宋蕉 (Taiwan Latundan) 組織，南投國姓、草屯及香蕉試驗所提供之香蕉黃葉病菌 (BFO0310、BFT105、BFT202、BFO21、BFO22、BFO23、BFO24、BFO25、BFO26、BFO27、BFO28、BFO29、BFO30；其中 BFO0310 之「S」為正常之具病原性菌株，而「R」為已變異之菌株，其病原性已減弱) 及番茄晚疫病菌 *Phytophthora infestans* (Phy) 等菌株之菌絲 DNA，和水稻白葉枯病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Xcc) 之 DNA 進行 RAPD 分析之電泳圖。M：100 bp DNA ladder，為其 DNA 大小之標幟 (size marker)。